

Applicazione di un protocollo di screening differenziale nel sistema *Vitis vinifera* per l'identificazione di peptidi con attività antimicrobica

Bonura A.¹, Longo A.¹, Longo V.¹, Vlah S.¹, Mercati F.², Masullo T.³, Nicosia A.³, Tagliavia M.³, Salamone M.³, Cuttitta A.³, Carimi F.², Colombo P.¹

¹Istituto di Biomedicina e di Immunologia Molecolare
del Consiglio Nazionale delle Ricerche
Via Ugo La Malfa 153
90146 Palermo
Italia

²Istituto di Bioscienze e Biorisorse
del Consiglio Nazionale delle Ricerche
Corso Calatafimi, 414
90129 Palermo
Italia

³ Istituto per l'Ambiente Marino Costiero UOS di Capo Granitola
Del Consiglio Nazionale delle Ricerche
Via del Mare, 3
91021 Torretta Granitola
Campobello di Mazara -Trapani
Italia

Rapporto tecnico – Luglio 2016

Sommario

Introduzione	3
1. Protocollo per l'identificazione di geni differenzialmente espressi in embrioni di Vitis vinifera.....	4
1.1 Screening differenziale.....	4
1.2 Clonaggio dei cDNAs differenzialmente espressi nel vettore di sequenziamento pCR®2.1-TOPO...	14
1.3 Isolamento dei cloni ricombinanti di Vitis vinifera e loro sequenziamento.....	15
2 Analisi in banca dati delle sequenze di Vitis vinifera isolate.....	17
Bibliografia.....	18

Introduzione

Le piante e gli animali presentano elementi comuni nel loro sistema di difesa contro gli agenti patogeni, come la sintesi diretta di enzimi idrolitici (chitinasi, glucanasi, proteinasi e ossidasi) e di peptidi antimicrobici (AMPs). [1, 2]. Gli AMPs sono peptidi ampiamente espressi negli organismi animali (vertebrati e invertebrati) e nelle piante. Possono essere espressi costitutivamente o rapidamente indotti in seguito ad uno stimolo biotico, a differenti livelli cellulari, per interagire direttamente con l'agente infettante e/o per modulare la risposta immunitaria contro i patogeni [3]. Tali peptidi sono oggi classificati in relazione alle loro caratteristiche biochimiche (carica netta) e/o alle loro caratteristiche strutturali (composizione amminoacidica, struttura lineare o circolare). In base a queste caratteristiche le molecole possono essere distinte nei seguenti gruppi: 1) peptidi lineari ad alfa elica; 2) peptidi ciclici con β -sheets e due o più ponti disolfuro; 3) peptidi con alfa elica e β -sheets stabilizzati da ponti disolfuro; 4) peptidi con hairpin o loop stabilizzati da ponti disolfuro; 5) peptidi lineari con residui amminoacidici ripetuti, come prolina, glicina, triptofano o istidina; 6) piccoli peptidi con struttura avvolta o con una struttura secondaria non definita [4]. Nonostante la loro diversità strutturale, i peptidi antimicrobici presentano la caratteristica comune di inibire la crescita di un largo spettro di microbi, quali Gram-positivi, Gram-negativi, funghi e in alcuni casi anche virus, tanto da far coniare il termine di "antibiotici naturali". Negli ultimi anni è notevolmente incrementato l'interesse verso tali peptidi dal momento che dati scientifici hanno mostrato che questi non inducono lo sviluppo di meccanismi di resistenza nei microrganismi patogeni. Gli AMPs quindi potrebbero costituire una valida alternativa non solo in ambito sanitario, per la sostituzione di antibiotici di sintesi chimica e di origine microbiologica, ma potrebbero avere un importante utilizzo in campo industriale e nello sviluppo di nuovi sistemi di conservazione degli alimenti al fine di incrementare la loro "shelf-life".

Protocollo per l'identificazione di geni differenzialmente espressi in embrioni di *Vitis vinifera*

1.1 Screening differenziale

La vite (*Vitis vinifera* L.) oltre ad essere un'importante risorsa economica nazionale e regionale, rappresenta un'unica fonte di sostanze biologicamente attive. Studi recenti hanno infatti evidenziato che le piante producono un buon numero di proteine e peptidi che vengono secreti negli spazi extracellulari, giocando un ruolo fondamentale nella risposta agli stress, nella comunicazione intracellulare e nello sviluppo. Questo tipo di meccanismo è stato dimostrato anche per gli embrioni somatici che, durante le prime fasi di sviluppo, sono caratterizzate dall'induzione di molti geni stress-dipendenti (ad esempio geni della famiglia delle kinasi, come le SnRK, o i geni glutathione-S-transferase) e dalla produzione di proteine biologicamente attive di particolare interesse. Dunque per identificare nuove molecole, in particolare peptidi con attività antimicrobica, campioni di Nero d'Avola in differenti fasi di sviluppo, uno precoce (embrione) e l'altro avanzato (plantula), sono stati analizzati attraverso uno screening differenziale. Per effettuare lo screening differenziale sono stati estratti 5 µg di RNA messaggero (mRNA), ovvero il 5% del RNA totale, sia da embrioni che da plantule di vite. L'mRNA è stato estratto utilizzando il Dynabeads® mRNA DIRECT™ Kit (Life technologies), secondo le specifiche del produttore. Il Dynabeads® mRNA DIRECT™ Kit è stato selezionato in quanto è un sistema semplice e rapido appositamente disegnato per isolare direttamente l'mRNA poliadenilato (polyA) da tessuto vegetale. Il sistema si basa sulla formazione di un legame tra il polyA⁺ all'estremità 3' dell'mRNA ed i residui oligo (dT)₂₅ legati covalentemente alla superficie delle biglie chiamate Dynabeads. La concentrazione e qualità dell'mRNA estratto è stata valutata su spettrofotometro ND1000 (Nanodrop - Thermo) ed attraverso il 2100 Bioanalyzer (Agilent). Il Sistema utilizzato per lo screening differenziale è stato il “*PCR-Select cDNA Subtraction Kit*” della Clontech. In particolare, gli RNA polyA⁺ (2 µg) di vite estratti da individui allo stadio di plantula “P” e di embrione “E”, sono stati convertiti in popolazioni di cDNA, mediante retrotrascrizione. Grazie ad una serie di reazioni enzimatiche, di seguito riportate, si è ottenuta una popolazione di cDNAs di embrione differenzialmente espressa.

- **Sintesi Del First-Strand cDNA**

Sono state effettuate due reazioni in parallelo, seguendo gli schemi sotto riportati:

	“P”	“E”
• RNApolyA+ RNA VITE “P”	4µl	--
• RNApolyA+ RNA VITE “E”	--	4µl
• cDNA synthesis primer	1µl	1µl

Incubazione a 70°C per 2'

Incubazione in ghiaccio per 2'

• 5X First-Strand buffer	2 µl	2 µl
• dNTPs mix (10 mM)	1 µl	1 µl
• H ₂ O RNAsi free	1 µl	1 µl
• AMV RT (20U/µl)	1 µl	1 µl

Volume finale	10µl	10µl
---------------	------	------

I due campioni sono stati quindi incubati a 42° per 1,5 h.

- **Sintesi del Second-Strand cDNA**

Ad ognuno dei due campioni sono stati aggiunti:

	“P”	“E”
• H ₂ O Rnasi-free	48,4 µl	48,4 µl
• “Second strand buffer 5X”	16 µl	16 µl
• dNTP mix (10 mM)	1,6 µl	1,6 µl
• “20X second strand E. C.”	4 µl	4 µl

Volume finale	70 µl	70 µl
---------------	-------	-------

Incubazione a 16°C per 2h

Digestione campione “cDNA E”

● cDNA “E”	44 µl
● 10X RsaI buffer	5 µl
● Enzima Rsa I (10 U/µl)	1 µl

Volume finale	50 µl
---------------	-------

Incubazione per 1,5 h a 37°C

Un'aliquota delle due reazioni è stata analizzata insieme ai cDNA “P” ed “E” non digeriti (C) mediante elettroforesi su gel di Agarosio 1,5% in TBE 1X. Dal momento che la tecnica di elettroforesi su gel d'agarosio non è sufficientemente sensibile per visualizzare quantità di DNA inferiori a 5ng/µl, è stata effettuata, sui cDNA “P” ed “E”, una PCR di controllo con oligonucleotidi specifici per l'amplificazione del gene della β -defensina di *Vitis vinifera*, *AMP1*. Da ora in avanti il cDNA “P” verrà denominato “cDNA Driver” (D), quello ottenuto da embrioni “cDNA Tester” (T).

Schema di reazione

	“T”	“D”
● cDNA Tester	1 µl	--
● cDNA Driver	--	1 µl
● 10X PCR Buffer (200 mM Tris-HCl(PH 8,4), 500 mM KCL)	5 µl	5 µl
● dNTP's (10 mM)	1 µl	1 µl
● MgCl ₂ (50 mM)	2 µl	2 µl
● Oligo F-defensina (100 ng/µl)	2 µl	2 µl
● Oligo R- defensina (100 ng/µl)	2 µl	2 µl
● Platinum Taq Polimerasi (1U/µl)	0,5µl	0,5 µl
● H ₂ O	36,5µl	36,5 µl
Volume Finale	50 µl	50 µl

Entrambe le reazioni di PCR hanno dato l'amplificato delle dimensioni attese (234 bp). La digestione con *RsaI* è stata quindi bloccata con 2,5 µl di “20X EDTA/glicogeno”, i campioni sono stati purificati con 50 µl di fenolo-cloroformio/alcool isoamilico (25:24:1) e precipitati con 25 µl di Ammonio-Acetato (7,5 M, e pH 7,4) e 200 µl di etanolo al 96%; i pellet sono stati infine risospesi in 5,5 µl di H₂O sterile.

- **Ligasi adaptor 1 e 2r al cDNA tester**

Prima di effettuare le reazioni di ligasi, il cDNA Tester è stato diluito 1:5 con H₂O sterile. Sono state effettuate quindi due diverse reazioni di ligasi con due diversi adattatori (1 e 2) procedendo come segue:

Ligasi mix:

● H ₂ O sterile	7 µl
● “5X ligation buffer”	5 µl
● T4 DNA ligasi (100 U/µl)	2,5 µl
<hr/>	
Volume finale	14,5 µl

Reazioni di ligasi Adaptor 1

● cDNA Tester (1:5)	2 µl
● Adaptor 1 (10 µM)	2 µl
● Ligasi mix	6 µl
<hr/>	
Volume finale	10 µl

Reazione di ligasi Adaptor 2R

● cDNA Tester (1:5)	2 µl
● Adaptor 2R (10 µM)	2 µl
● Ligasi mix	6 µl
<hr/>	
Volume finale	10 µl

Un'aliquota di entrambe le reazioni (1C) è stata conservata per effettuare successivamente un controllo sull'avvenuta ibridazione. I campioni sono stati incubati a 16°C O.N., infine l'enzima è stato bloccato mediante aggiunta di 1 µl di EDTA/glicogeno mix (0.2 M EDTA; 1 mg/ml Glicogeno) e inattivazione al calore (72°C per 5').

- **Prima ibridazione**

Le due popolazioni di cDNA Tester (Tester 1 e Tester 2) sono state sottoposte ad una prima reazione di Ibridazione con il cDNA Driver.

Reazione H1

● cDNA Driver	1,5 µl
● cDNA Tester-Adpt1	1,5 µl
● “4X Hybridation buffer”	1 µl
<hr/>	
Volume finale	4 µl

Reazione H2

● cDNA Driver	1,5 µl
● cDNA Tester-Adpt2R	1,5 µl
● “4X Hybridation buffer”	1 µl
<hr/>	
Volume finale	4 µl

Dopo l'aggiunta di 5 µl di olio minerale (per evitare l'evaporazione dei campioni), i due campioni sono stati incubati a 98°C per 1,5 minuti e successivamente a 68°C per 8 ore.

- **Seconda ibridazione**

I prodotti ottenuti dalla prima ibridazione sono stati sottoposti nuovamente a reazione di ibridazione con il cDNA Driver.

Preparazione della reazione “mix Driver”

● Driver cDNA	1 μ l
● “4X Hybridation buffer”	1 μ l
● H ₂ O sterile	2 μ l
<hr/>	
Volume finale	4 μ l

Un tubo contenente 1 μ l di “mix Driver” e 2,5 μ l di olio minerale è stato incubato a 98°C per 1'30" e quindi in ghiaccio. Seguendo il protocollo fornito dal kit, l'intero campione H2 ed 1 μ l di “mix driver” sono stati aggiunti al campione H1, mischiati con cura e incubati a 68°C O.N.

In seguito il cDNA ottenuto da questa seconda reazione di Ibridazione è stato diluito con 200 μ l di “dilution buffer” e incubato a 68°C per 7'.

PCR

E' stata effettuata una PCR con oligonucleotidi in grado di appaiarsi soltanto con una delle cinque tipologie di molecole di DNA, prodotte dalle precedenti tecniche di ibridazione, ovvero (vedi Fig1):

- molecole di DNA a singolo filamento con e senza adattatori al 5';
- molecole di DNA a doppio filamento senza adattatori ad entrambe le estremità;
- molecole di DNA a doppio filamento con adattatori uguali al 5' di entrambi i filamenti;
- molecole di DNA a doppio filamento con adattatori uguali sia al 5' che al 3' di entrambi i filamenti;
- molecole di DNA a doppio filamento con adattatori diversi (sia Adpt1 che

Adpt2R) ad entrambe le estremità sia 5' che 3', in entrambi i filamenti.

Sono state solo queste ultime a poter essere amplificate dalla reazione di PCR, in quanto gli oligonucleotidi utilizzati per la reazione di amplificazione erano in grado di appaiarsi l'uno con l'adattatore 2R e l'altro con l'adattatore 1. Grazie a questa reazione di PCR si è riusciti quindi ad amplificare soltanto quelle molecole di DNA che sono il risultato dell'appaiamento tra il cDNA Tester-Adpt1 e il cDNA Tester-Adpt2. Come controllo viene effettuata in parallelo una reazione di PCR sul cDNA 1C che rispecchia i cDNA tester non sottoposti a reazione di ligasi con i due adattatori.

PCR mix :

● 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl PH 8,4, 500 mM KCl)	6,25 µl
● MgCl ₂ (50 mM)	2,5 µl
● dNTP mix (10 mM)	1,25 µl
● H ₂ O	46,25 µl
<hr/>	
Volume finale	56,25 µl

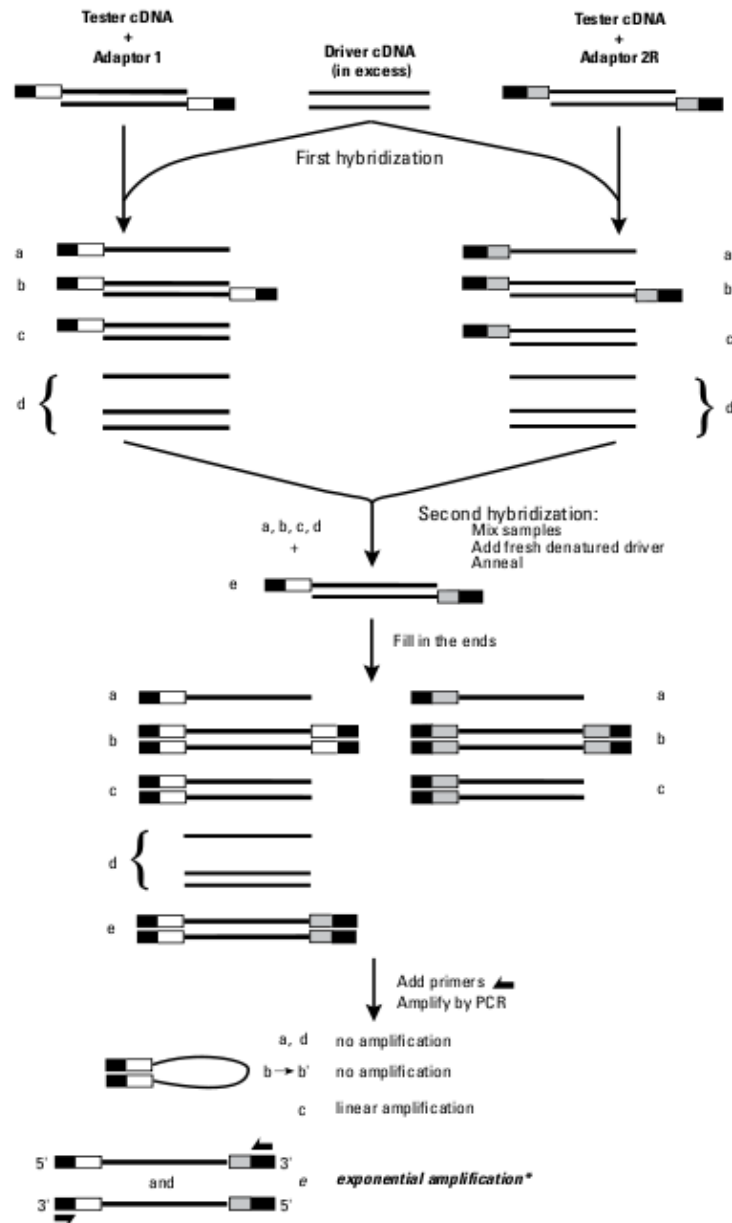


Fig.1: rappresentazione schematica delle due reazioni di ibridazione amplificazione terminale con gli oligo specifici per i due adattatori. Vengono anche elencate le cinque tipologie di DNA prodotte dalle due ibridazioni.

<u>Schema delle reazioni</u>	Hy	1C
● cDNA (Seconda ibrid.)	1 µl	--
● cDNA 1C	--	1 µl
● PCR primer 1 (10µM)	1 µl	1 µl
● Platinum Taq Polimerasi (1U/µl)	0,5 µl	0,5 µl
● PCR mix	22,5 µl	22,5 µl
<hr/>		
Volume finale	25 µl	25 µl

Programma di reazione

75°C 5' (questo step permette il “Fill-in” alle estremità dei due adattatori)

94°C 2'

94°C 30"	} 30 cicli
66°C 30"	
72°C 1,5'	

72°C 2'

Nested PCR sul Campione Hy

E' stata effettuata una reazione di “Nested PCR” sul campione Hy per incrementare ulteriormente il numero delle copie di cDNA ottenute nella seconda ibridazione.

● Stampo (PCR Hy diluito 1:10)	2 µl
● 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl PH 8,4, 500 mM KCl)	2,5 µl
● MgCl ₂ (50 mM)	1 µl
● dNTPs (10 mM)	0,5 µl
● Nested PCR primer 1 (10 µM)	3 µl
● Nested PCR primer 2 (10 µM)	3 µl
● Platinum Taq Polimerasi	0,5 µl
● H ₂ O	12,5 µl
<hr/>	
Volume finale	50 µl

Un'aliquota di entrambe le reazioni di amplificazione e del controllo negativo (PCR condotta sul campione 1C) è stata saggiata mediante corsa elettroforetica su gel d' agarosio 1,5 % in TBE1X. Come atteso l'amplificazione sul cDNA 1C, mancante degli adattatori, non ha dato alcun prodotto; dalla reazione di “Nested PCR” sono state ottenute invece numerose bande di dimensioni diverse.

1.2 Clonaggio dei cDNAs differenzialmente espressi nel vettore di sequenziamento pCR[®] 2.1-TOPO

I cDNAs differenzialmente espressi di embrione di Vite sono stati clonati nel vettore di sequenziamento pCR[®] 2.1-TOPO Fig.2, utilizzando il “TOPO TA cloning[®] kit for sequencing” della Invitrogen. Questo consente il clonaggio rapido (5 minuti) del prodotto di PCR nel vettore; E' necessario però che la Taq polimerasi, utilizzata per il processo di amplificazione abbia attività 3'-adenosin-transferasi terminale, in modo che i frammenti presentino una deossiadenosina all'estremità 3' che completerà con la singola deossitimina sporgente alle estremità 3' del vettore, fornito in forma linearizzata e legato covalentemente alle Topoisomerasi I del *Vaccinia virus*. La topoisomerasi virale riconosce specificamente la sequenza 5'-CCTT-3' presente alle estremità del vettore e digerisce il DNA a livello di questa sequenza; L'energia liberata dalla rottura di questo legame, viene conservata poiché è impiegata per la formazione di un legame covalente tra il 3' fosfato del filamento tagliato e il residuo di Tyr-274 della topoisomerasi I. Il legame fosfotirosile tra DNA ed enzima viene successivamente attaccato dal 5'OH del filamento iniziale, con conseguente rilascio della topoisomerasi e formazione di un legame covalente tra le estremità del vettore e quelle dell'inserto.

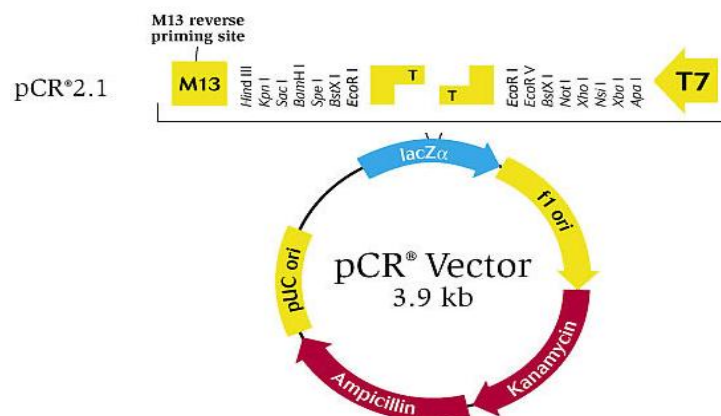


Fig.2 Mappa del vettore TopoTA pCR2.1

Un'aliquota della reazione di clonaggio è stata quindi utilizzata per trasformare 50µl di cellule competenti TOP 10; Per la reazione di trasformazione è stato seguito il protocollo della ditta fornitrice delle cellule (Invitrogen). Queste sono state quindi seminate su terreno selettivo (LB Agar, 100mM Ampicillina) e cresciute a 37°C O.N. Sono state ottenute circa 400 colonie ricombinanti, che sono state trasferite, mediante picking, su terreno selettivo fresco e successivamente numerate.

1.3 Isolamento dei cloni ricombinanti di *Vitis vinifera* e loro sequenziamento

Inizialmente si è proceduto all'analisi di 50 colonie, mediante PCR colony (TaKara TaqTM), utilizzando i primers specifici del vettore, M13 Forward (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') ed M13 Reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Le reazioni sono state condotte in un volume finale di 50 µl (1X Buffer, 2,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP mix, primers 100ng/reazione ciascuno, 1,25 U/reazione Takara Taq), seguendo il programma descritto di seguito:

94°C x 5'	
94°C x 30''	} 30 cicli
52°C x 30''	
72°C x 30''	
72°C x 5'	

Dei cloni analizzati, 34 sono risultati ricombinanti (Fig. 3), i frammenti raggruppati in famiglie sono stati sottoposti a mappatura, mediante digestione con gli enzimi di restrizione quali *Alu I* ed *Rsa I*. L'analisi comparativa su gel d'agarosio del pattern di bande di restrizione, liberato dai frammenti che avevano le medesime dimensioni, ha permesso di discriminare i cloni tra loro differenti e di selezionarne dieci da sottoporre a sequenziamento genico. Sono stati pertanto preparati i DNA plasmidici dei cloni risultati differenti all'analisi, facendoli crescere O.N. a 37 °C in terreno selettivo (LB medium, 100mM Ampicillina) e sottoponendoli ad estrazione, utilizzando il kit EuroGold Plasmid Miniprep (Euroclone). Il DNA plasmidico ottenuto è stato controllato prima su gel d'agarosio per valutarne l'integrità ed escludere contaminazioni da parte di RNA batterico e,

successivamente, è stato quantizzato allo spettrofotometro (OD 260 nm); un'aliquota pari a 250 ng di plasmide è stata inviata per il sequenziamento.

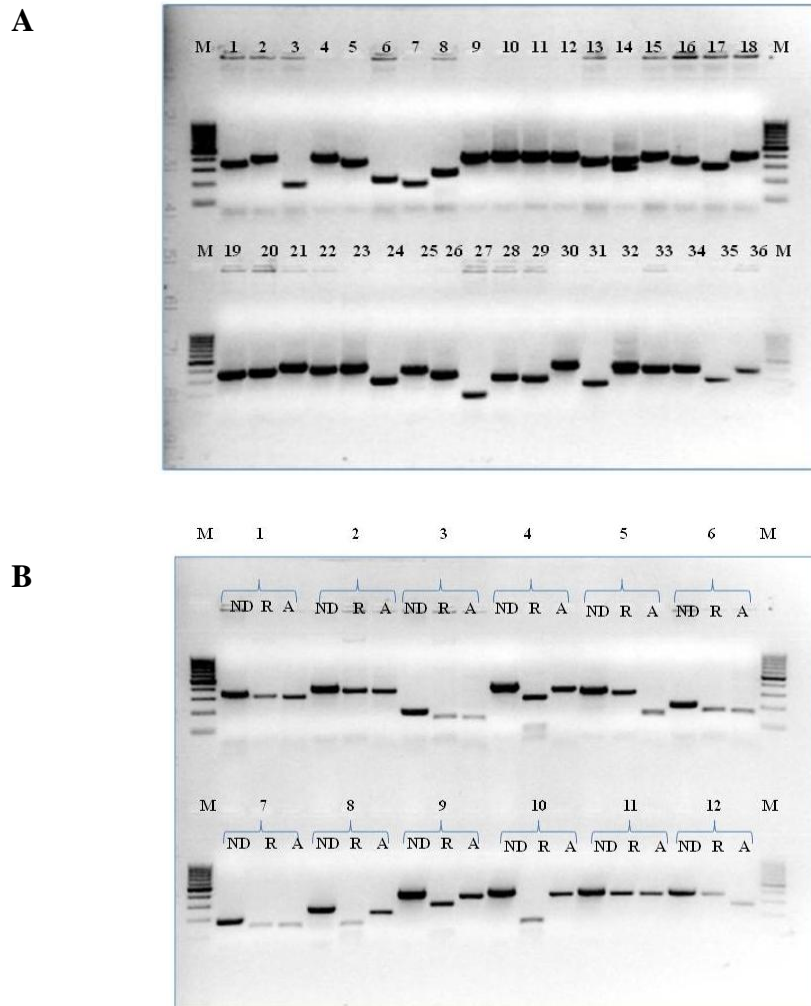


Fig.3 Elettroforesi su gel d'agarosio. A) Pcr colony dei cloni ricombinanti di *Vitis vinifera* nel vettore TopoTA pCR 2.1. **B)** Digestione degli amplificati con gli enzimi di restrizione *RsaI* (R) e *AluI* (A) paragonati con lo stesso frammento non digerito (ND).

L'analisi in banca dati delle sequenze ha evidenziato omologie del 100% con sequenze EST di *Vitis vinifera*. Si è quindi deciso di estendere lo screening ad altri cloni ricombinanti, selezionati casualmente tra le 400 colonie iniziali e di questi, 153 campioni di DNA sono stati inviati per il sequenziamento.

2 Analisi in banca dati delle sequenze di *Vitis vinifera* isolate

Tutte le sequenze di cDNA di *Vitis vinifera* ottenute sono state sottoposte ad analisi comparativa con le sequenze nucleotidiche pubblicate in banca dati, al fine di trovare delle omologie e similarità con geni noti. I server utilizzati per le analisi sono:

- **FASTA NUCLEOTIDE:** <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/nucleotide.html>
- **BLAST NUCLEOTIDE:** https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch

Grazie a queste ricerche è stato possibile determinare, per ogni clone, la sequenza EST corrispondente con la più alta percentuale d'identità. Utilizzando "Expasy-Translate tool" è stato possibile estendere le analisi in banca dati alle sequenze proteiche dedotte, per identificare eventuali omologie con proteine caratterizzate o la presenza di domini conservati. I software impiegati per le analisi delle omologie sono:

- **"EXPASY BLAST"** : <http://web.expasy.org/blast/>
- **"FASTA SIMILARITY SEARCH"**: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>

Mentre quelli utilizzati per l'identificazione di eventuali domini proteici conservati sono:

- **Delta Blast:**
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=deltaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=BlastHomeAd
- **InterPro: protein sequence analysis & classification:** <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>

La validità di tale sistema di screening per l'identificazione di peptidi con attività antimicrobica è dimostrata dall'isolamento di due cloni in grado di esprimere le sequenze codificanti per la puroindolina β e la Thaumatin-like protein (TLPs). Le puroindoline α e β (Pin-a e Pin-b) giocano un ruolo significativo nella difesa delle piante dai batteri patogeni, esse infatti legano i lipidi della membrana provocando la lisi cellulare [5]. La Thaumatin-like protein (TLPs) appartiene alla famiglia delle pathogenesis-related protein 5 (PR5), la cui espressione è indotta da stress, come l'attacco di patogeni, siccità e freddo [6].

Bibliografia

- [1] Odintsova T., Egorov T. Plant antimicrobial peptides. In: Irving HR, Gehring C., editors. Plant signaling peptides. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2012.p.107-33.
- [2] Garcia-Olmedo F., Molina A, Alamillo J.M.,Rodriguez-Palenzuela P Plant defence peptides. Biopolymers 1998; 47:479-91
- [3] Otero-Gonzalez, A. J.,Magalhães, B. S., Garcia-Villarino, M., Lo´pez-Abarrategui,C., Sousa, D. A., Dias, S. C., Franco, O. L. “Antimicrobial peptides from marine invertebrates as anew frontier for microbial infection control”. (2010) FASEB J. 24, 1320–1334.
- [4] Rahnamaeian M. Antimicrobial peptide: modes of mechanism, modulation of defence responses. Plant Signal Behav 2011;6:1325-32.
- [5] Clifton LA1, Sanders MR, Hughes AV, Neylon C, Frazier RA, Green RJ Phys Chem Chem “Lipid binding interactions of antimicrobial plant seed defence proteins: puroindoline-a and β -purothionin”. Phys. 2011 Oct 14;13(38):17153-62.
- [6] Misra RC, Sandeep, Kamthan M, Kumar S, Ghosh S.”A thaumatin-like protein of Ocimum basilicum confers tolerance to fungal pathogen and abiotic stress in transgenic Arabidopsis”. Sci Rep. 2016 May 6;6:25340. doi: 10.1038/srep25340.